细菌表达 dsRNA 介导的家蚕 FTZ-F1 基因的 RNA 干扰

王根洪[1,2]，祝慧敏[1]，罗会松[1]，王轲轲[1]，杨小波[1]，蒋　亮[2]，夏庆友[1,2,*]
（1. 重庆大学农学及生命科学研究院，重庆 400044；2. 西南大学生物技术学院，农业部蚕桑学重点开放实验室，重庆 400715）

摘要：为探索细菌表达目标基因 dsRNA 介导的 RNAi 技术是否在家蚕 *Bombyx mori* 可行，本研究引入了在其他物种中广泛应用的细菌表达 dsRNA 的 RNAi 系统：HT115 细菌株和 L4440 质粒。利用 L4440 载体两端含有 T7 启动子的特点，设计并构建了针对家蚕核受体 FTZ-F1 基因的 RNA 干扰（RNA interference）载体，将构建好的质粒转入大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115，在 IPTG 诱导下成功获得目标基因对应双链 RNA（dsRNA）。结果显示：通过对 5 龄第 7 天家蚕幼虫注射 IPTG 诱导后提取的 FTZ-F1 基因对应的 dsRNA 25 μg，85% 的蛹变态发育过程明显延迟，不能实现幼虫到蛹的形态完全转变。荧光定量 PCR 分析显示目标基因的表达得到了特异的抑制。实验结果初步表明，通过细菌表达目标基因 dsRNA 介导的 RNAi 策略，以其经济、高效的特点，具有广泛应用于家蚕基因功能研究中的潜力。
关键词：家蚕；RNA 干扰；双链 RNA；L4440 质粒；HT115 细菌株；变态发育
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)05-0596-06

RNA interference of FTZ-F1 gene mediated by bacterially expressed dsRNA in the silkworm, *Bombyx mori*

WANG Gen-Hong[1,2], ZHU Hui-Min[1], LUO Hui-Song[1], WANG Ke-Ke[1], YANG Xiao-Bo[1], JIANG Liang[2], XIA Qing-You[1,2,*] (1. Institute of Agriculture and Life Sciences, Chongqing University, Chongqing, 400044, China; 2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: We developed a method of RNA interference based on bacterially expressed dsRNA in the silkworm, *Bombyx mori*. By inserting the target, FTZ-F1 gene fragment, between the two convergent T7 polymerase promoters in opposite orientation in L4440 dsRNA expression vector, the recombinant plasmid was formed. Then the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* HT115, an RNase-III deficient strain. dsRNA was extracted from the *E. coli* HT115 after being treated with isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG). RNAi treatment was performed by injecting the extracted dsRNA (25 μg) into body cavity of silkworm at the 7th day of 5th instar. The RNAi of FTZ-F1 gene resulted in 85% of the insects with delay of pupal metamorphosis and disablement in pupa formation. Real-time quantitative PCR analysis revealed that the expression of FTZ-F1 gene was specially inhibited after the insects were treated with dsRNA of FTZ-F1 gene. The results suggest that the bacterially expressed dsRNA has potential to be used in silkworm functional genome analysis in an economical and efficient way.
Key words: *Bombyx mori*; RNA interference; dsRNA; L4440 plasmid; HT115 *Escherichia coli* strain; metamorphosis

随着家蚕 *Bombyx mori* 基因组序列图谱的完成，对获得的大量基因进行功能鉴定是当前桑蚕分子生物学领域的一个重要课题（Xia *et al.*, 2004; The International Silkworm Genome Consortium, 2008; Xia *et al.*, 2009）。RNAi（RNA interference）通过 dsRNA 可以高效、特异地阻断或降低体内特定基因的表达，是近年来倍受研究者青睐的基因功能研究手段（Fire *et al.*, 1998）。目前在家蚕中采用的 RNAi 实验操作主要有两种。一种是利用已有的转基因技术进行可遗传的干扰方法，即通常称作的转基因 RNAi 技术（Dai *et al.*, 2007）。常用的转基因干扰方法是借助于 *piggBac* 转座子，向家蚕基因组导入外源能转录产生目标基因 dsRNA 的干扰骨架，使得家蚕体内自身稳定地产生 RNA 干扰效应分子。

基金项目：国家自然科学基金项目（30901054; 31001034; 30671591）；长江学者和创新团队发展计划（IRT0750）
作者简介：王根洪，男，1980 年生，四川绵竹人，讲师，研究方向为功能基因组学及转基因遗传改良，E-mail: wanggh@cqu.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 023-65112534; E-mail: xiaqy@swu.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-11-26；接受日期 Accepted: 2011-01-20

另外一种方法是通过体外转录合成目标基因 dsRNA 进行瞬时干扰的方法，体外转录的片段可以是与 siRNA 大小相当的短链干扰片段（王根洪等，2005），也可以是数百个核苷酸对的长链干扰片段（Uhlirova *et al.*，2003；Tabunoki *et al.*，2004；刘春等，2004；Wang *et al.*，2008）。与转基因 RNAi 技术相比，瞬时干扰具有操作简单及耗时少的特点，常被用于基因功能鉴定之中。但是，瞬时干扰实验中制备 dsRNA 所用的试剂是非常昂贵的，这使得在家蚕进行大规模 RNAi 实验非常困难。

为了克服大规模 RNAi 实验耗费巨大的困难，本研究拟采用在线虫等物种中广泛应用的通过细菌表达 dsRNA 的 RNAi 的方法（Timmons and Fire，1998；Timmons *et al.*，2001；Kamath and Ahringer，2003；Newmark *et al.*，2003），探索在家蚕通过特定的细菌株 HT115 表达目标基因对应的 dsRNA 进行 RNAi 的可行性。我们选择已经通过瞬时干扰获得干扰表象的 DNA 结合因子 FTZ-F1 基因作为靶标基因（Cheng *et al.*，2008），扩增目标基因片段，构建了以 L4440 作为载体骨架的 dsRNA 表达载体，转化进入大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115，诱导 dsRNA 表达；通过在家蚕个体注射细菌表达的 dsRNA，检测 RNAi 实验对 FTZ-F1 生物学功能的影响。

1　材料与方法

1.1　实验材料

以家蚕华系二化性品种大造（P50）为实验材料，在温度 25℃、相对湿度 80%、光周期 12L∶12D 的条件下用家蚕人工饲料饲育。取 5 龄第 7 天的家蚕幼虫个体分别用生理盐水和 DEPC 水冲洗后储存于液氮中，以备提取 RNA 所用。载体 L4440 购自 Addgene 组织；菌株 HT115 由国际线虫遗传学中心（Caenorhabditis Genetics Center）提供。

1.2　RNA 提取和引物设计

采用 TRlzol Reagent（Invitrogen 公司）提取家蚕个体总 RNA，经无 RNA 酶的 DNase I（TaKaRa 公司）处理去除 DNA 污染后，用 MMLV 反转录酶（Promega 公司）反转录得到 cDNA 第一链，此产物便可作为 FTZ-F1 基因扩增的模板用在后面的实验操作中。所有步骤均按相关试剂的使用说明书进行。引物设计采用软件 Primer Primer 5.0，根据 NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）公布的家蚕 FTZ-F1 基因（GenBank 登录号：AF426830）设计扩增引物序列 F1：5′-TCAAGTGGATTGGGCAAGA-3′，R1：5′-TAGCAGGTAAGAGTGTAGTCAAGAA-3′。

1.3　家蚕 FTZ-F1 基因片段的克隆及干扰载体构建

以上述合成的家蚕 cDNA 为模板，采用引物对 F1/R1 进行 PCR 扩增，反应条件为 95℃，3 min 预变性后，94℃，30 s 变性，54℃，45 s 退火，72℃，40 s 延伸，共 30 个循环，72℃ 终延伸 10 min 后，4℃保存。获得的 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳并回收纯化，回收片段与 pMD18-T 载体（TaKaRa 公司）TA 连接，连接产物转化至 JM109 感受态细胞菌株后，涂布于加有氨苄青霉素、IPTG（TaKaRa 公司）、X-gal（TaKaRa 公司）的固体 LB 培养基平板上，培养 12 h 左右，挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中培养。采用 EasyPure Plasmid MiniPrep Kit 试剂盒（TransGen Biotech Co., Ltd.）提取质粒，电泳检测重组质粒并对其进行 PCR 及双酶切鉴定。重组质粒进一步进行测序验证。

干扰载体的构建策略如图 1 所示，将已经构建好的 FTZ-F1-pMD18-T 载体与 L4440 载体分别同时用 *Kpn* Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ（TaKaRa 公司）进行双酶切，回收连接后，转化 JM109 感受态细胞菌株后，涂布于加有氨苄青霉素的固体 LB 培养基平板上，培养 12 h 左右，挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中培养。提取质粒，进行 T7 单引物（5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′）PCR 扩增及双酶切鉴定阳性克隆。重组质粒进一步通过测序进行验证。

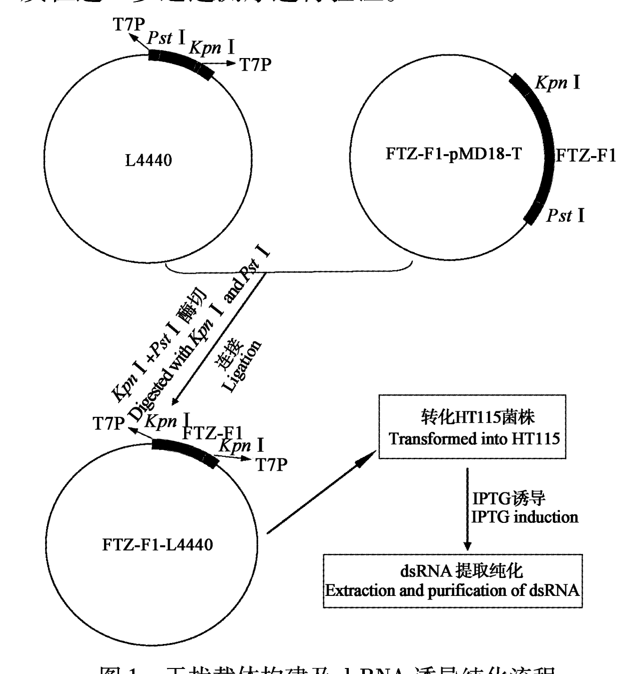


图 1　干扰载体构建及 dsRNA 诱导纯化流程

Fig. 1　Schematic presentation of RNAi plasmid construction and dsRNA producing process

1.4 dsRNA 诱导表达及提取纯化

如图 1 所示，采用标准的 $CaCl_2$ 转化方法，将已构建好的 FTZ-F1-L4440 载体转入 HT115 感受态细胞菌株中，通过 PCR 筛选含有重组质粒的转化子。37℃振荡培养含有 FTZ-F1-L4440 质粒的菌液至 OD_{600} = 0.5，加 IPTG(终浓度为 0.7 mmol/L)进行诱导表达，37℃振荡培养 4 h 用于 dsRNA 的提取。采用 TRlzol Reagent 提取细菌总 RNA。RNA 干燥后溶于无核酸酶的灭菌水中，并进行电泳检测；dsRNA 的纯化参照 Gan 等(2010)报道的方法进行，分别用 DNase I 及含有 0.5 mol/L NaCl 的 RNase A 消化纯化提取的 RNA，酚/氯仿抽提后，用乙醇沉淀析出目标 dsRNA，最后用无 RNase 的 H_2O 溶解沉淀并进行浓度测定，-80℃保存以备用于 RNAi 实验。

1.5 RNAi 处理

取 120 头 5 龄第 7 天的家蚕大造幼虫，均分为 3 组。一组注射通过细菌表达提取的 dsRNA：FTZ-F1-dsRNA，每头注射 25 μg dsRNA；一组注射事先通过转录试剂盒合成的红色荧光蛋白(RFP)对应的双链 RNA：RFP-dsRNA，每头注射 25 μg dsRNA；另外一组添食经过 IPTG 诱导后的含有 FTZ-F1-L4440 质粒的 HT115 菌液：FTZ-F1-L4440-HT115，经估算，平均每头摄食的菌液含有 FTZ-F1-dsRNA 约 25 μg。RNAi 注射及添食后，置正常条件下继续饲育，并观察直至化蛹 10 d。在吐丝后 48 h，每组随机分别取 3 头解剖收集脂肪体组织，按上述方法提取 RNA，合成 cDNA，通过荧光定量 PCR 技术检测 FTZ-F1 基因的 RNAi 处理后的表达变化情况。FTZ-F1 基因的荧光定量 PCR 引物为 F2：5′-CAAGTGGATTGGGCAAGA-3′，R2：5′-CCCTAACCTCGGGATTGA-3′，选择家蚕细胞质肌动蛋白 Actin 3 作为内参基因，其荧光定量 PCR 引物为 F3：5′-CATGAAGATCCTCACCGAGCG-3′，R3：5′-CGTAGCACAGCTTCTCCTTGATA-3′。荧光定量 PCR 实验在 ABI 7000 定量 PCR 仪上进行，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析荧光定量 PCR 实验结果(Livak and Schmittgen, 2001)。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增、重组及克隆

提取 5 龄第 7 天家蚕幼虫的总 RNA，反转录为 cDNA，以 F1 和 R1 引物进行 PCR 扩增，根据基因序列，预期扩增片段大小为 392 bp，而 PCR 扩增片段的电泳结果显示，扩增片段介于 250～500 bp 之间(图 2：A)，与预期相符。将目标条带胶回收后连接到 pMD18-T 载体得到 FTZ-F1-pMD18-T 重组质粒，重组质粒经测序证实家蚕 FTZ-F1 基因片段已经连入重组质粒。

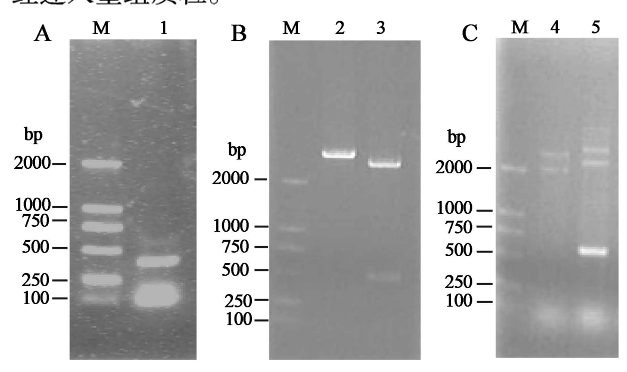


图 2 干扰表达载体构建过程中部分电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis in the construction of RNAi plasmid

M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker DL2000；A：FTZ-F1 基因片段 PCR 产物 PCR products of FTZ-F1 gene fragment；B：FTZ-F1-L4440 质粒 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切产物 Digestion products of FTZ-F1-L4440 plasmid with *Kpn* I and *Pst* I；C：FTZ-F1-L4440 质粒经过 T7 单引物扩增产物 PCR products of FTZ-F1-L4440 plasmid amplified with T7 primer. 1：FTZ-F1 的 RT-PCR 扩增 RT-PCR products of FTZ-F1 gene fragment；2：FTZ-F1-L4440 质粒 FTZ-F1-L4440 plasmid；3：FTZ-F1-L4440 质粒经 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切产物 Digestion products of FTZ-F1-L4440 with *Kpn* I and *Pst* I；4：FTZ-F1-pMD18-T 与 L4440 重组实验中阴性质粒 T7 单引物 PCR PCR products of the negative plasmid amplified with T7 primer；5：FTZ-F1-L4440 重组质粒 T7 单引物 PCR PCR products of the positive plasmid amplified with T7 primer.

2.2 dsRNA 表达载体的构建

根据图 1 的载体构建策略，FTZ-F1-pMD18-T 质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ双酶切，琼脂糖凝胶电泳分离得到目的 DNA 片段，回收该片段用于连接反应。同时提取 L4440 质粒用 *Kpn* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ双酶切，经琼脂糖凝胶电泳分离纯化，回收目标载体片段。将目的 FTZ-F1 基因片段连接到 L4440 载体中，转入 50 μL JM109 感受态细胞中，涂板，筛选阳性克隆，并提取质粒进行酶切验证及 T7 单引物 PCR 检测，如图 2(B)所示，重组质粒经 *Kpn* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ双酶切获得一条介于 250～500 bp 之间的目的条带。电泳检测显示，重组质粒经 T7 单引物 PCR 扩增后，能获得特定的目的条带(图 2：C)。经测序，结果显示 FTZ-F1 基因片段已成功构建进入 L4440 载体中，得到 FTZ-F1-L4440 重组质粒。

2.3　dsRNA 的诱导表达

将 FTZ-F1-L4440 质粒转入 HT115 菌株感受态细胞，扩大培养至菌液 OD_{600} 值达到 0.5 左右，加入 IPTG 诱导 4 h。诱导后的菌液用于总 RNA 的提取，RNA 提取结果如图 3 所示。从凝胶电泳结果(图 3)中可以看出，诱导后的 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液提取的 RNA 中有一条特异目标 RNA 条带，而未经 IPTG 诱导的 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液 RNA 中不含有此带，FTZ-F1-L4440-JM109 菌液诱导前后均不含有此带。据此判定诱导后的 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液出现的特异条带为细菌表达的 FTZ-F1 的 dsRNA 条带。

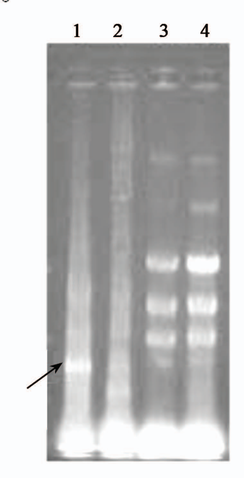


图 3　dsRNA 的诱导表达

Fig. 3　The induction of dsRNA

1：FTZ-F1-L4440-HT115 菌液诱导后 RNA 电泳 The RNA extract of FTZ-F1-L4440-HT115 after IPTG induction；2：FTZ-F1-L4440-HT115 菌液诱导前 RNA 电泳 The RNA extract of FTZ-F1-L4440-HT115 before IPTG induction；3：FTZ-F1-L4440-JM109 菌液诱导后 RNA 电泳 The RNA extract of FTZ-F1-L4440-JM109 after IPTG induction；4：FTZ-F1-L4440-JM109 菌液诱导前 RNA 电泳 The RNA extract of FTZ-F1-L4440-JM109 before IPTG induction. 黑色箭头示 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液诱导后出现的特异条带 The specific band emerged in FTZ-F1-L4440-HT115 after induced by IPTG was indicated by an arrow.

2.4　RNAi 结果与分子检测

将 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液获得的特异条带进一步经 DNase I 和 RNase A 的去除 DNA 及单链 RNA 的纯化处理，用于 RNAi 实验。由于在此前我们已经通过体外转录 dsRNA 的方法，成功阻扰 FTZ-F1 基因的表达，获得特定的干扰表型(Cheng *et al.*, 2008)，故本实验中在 dsRNA 剂量、注射时间等 RNAi 处理条件选择上基本依照上述实验方案进行。结果表明，注射 FTZ-F1-L4440-HT115 菌液诱导提取的 dsRNA 的实验组中，85% 的个体出现化蛹变态异常，主要表现为幼虫向蛹期的转变过程明显延迟，吐丝量减少，不能实现幼虫到蛹的形态的完全转变。如图 4(A)所示，在吐丝后第 4 天，注射 RFP 对应的 dsRNA 的蚕个体已经处于化蛹后第 2 天的状态，而注射 FTZ-F1 对应的 dsRNA 的虫体则刚处于幼虫向蛹发育变态的开始；吐丝后第 8 天，注射 FTZ-F1 对应的 dsRNA 的虫体变态发育明显受阻，保持在幼虫向蛹发育的中间状态(图 4：B)。而 95% 的添食 FTZ-F1-L4440-HT115 经 IPTG 诱导后的菌液的实验组与未作任何处理的家蚕个体一样，能正常完成幼虫到蛹的变态，无明显异常表象。为了检测 dsRNA 处理后，是否会引起 FTZ-F1 表达水平的变化，我们在吐丝上蔟后 48 h 收集材料，进行了荧光定量 PCR 检测。如图 5 所示，注射 FTZ-F1 对应 dsRNA 的实验组，其 FTZ-F1 基因的表达量明显低于注射红色荧光蛋白对应 dsRNA 的实验组。荧光定量 PCR 中基因扩增的特异性通过熔解曲线分析得到证实(图 6)。

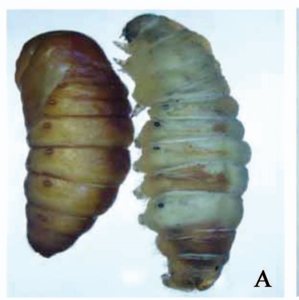




图 4　RNAi 处理后获得的干扰表型

Fig. 4　The phenotype of silkworm after RNAi treatment

A：吐丝后第 4 天(左：注射 RFP 对应的 dsRNA；右：注射 FTZ-F1 对应的 dsRNA) Silkworm at the 4th day after wandering (left: treated with dsRNA of RFP; right: treated with dsRNA of FTZ-F1)；B：吐丝后第 8 天(左：注射 RFP 对应 dsRNA；右：注射 FTZ-F1 对应 dsRNA) Silkworm at the 8th day after wandering (left: treated with dsRNA of RFP; right: treated with dsRNA of FTZ-F1).

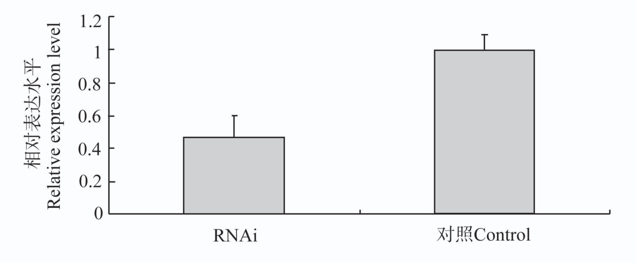


图 5　定量 PCR 分析家蚕 FTZ-F1 基因(*BmFTZ-F1*)表达水平

Fig. 5　The expression analysis of FTZ-F1 gene from *Bombyx mori* (*BmFTZ-F1*) by real-time quantitative PCR

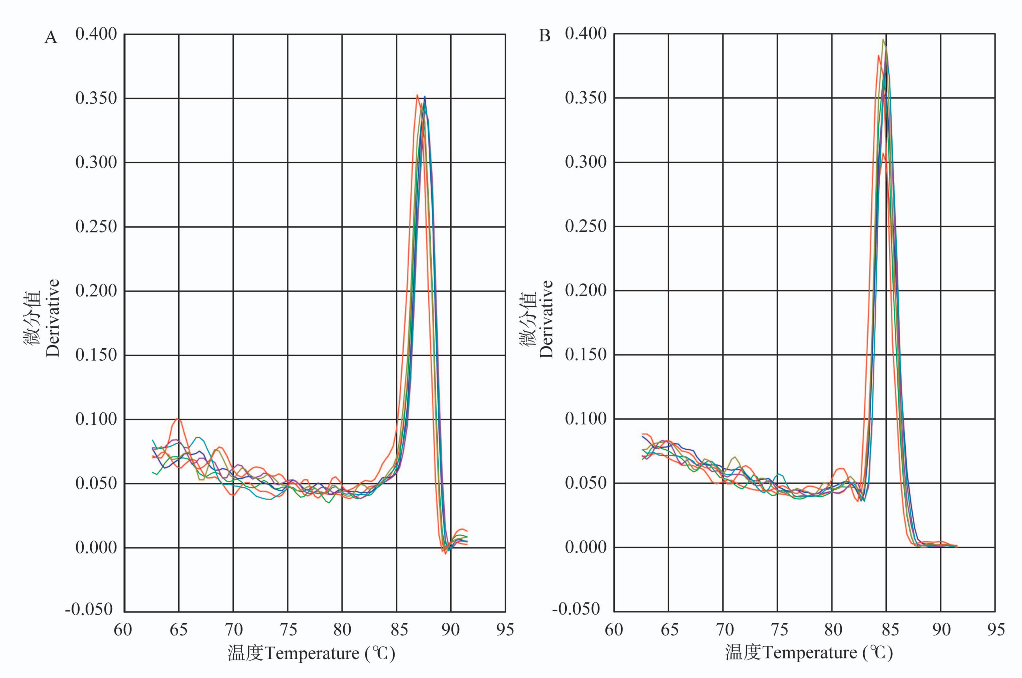


图 6　定量 PCR 分析中 *BmActin 3*(A)和 *BmFTZ-F1*(B)的熔解曲线

Fig. 6　The melting curves of *BmActin 3* (A) and *BmFTZ-F1* (B) in the real-time quantitative PCR

3　讨论

家蚕是重要的经济昆虫，同时也是鳞翅目昆虫的代表(向仲怀, 2003)。家蚕的基础研究对于提高蚕丝业经济效益及防控农林害虫等方面，均具有重大意义(向仲怀, 2003; 向仲怀和杨焕明, 2003)。令人欣慰的是，经过长期的积累，家蚕基础研究已经发展到相当高的水平，特别是近年来，随着家蚕基因组框架图、精细图及遗传变异图的完成，家蚕研究已正式进入阐释基因功能的后基因组时代(Xia *et al*., 2004; The International Silkworm Genome Consortium, 2008; Xia *et al*., 2009)。成千上万个预测基因，等待着科技工作者研究其功能，以便进而对其利用。然而，目前家蚕基因功能研究手段匮乏，尽管家蚕转基因技术已经建立，但家蚕转基因技术仍处于转化效率低、周期长的状态，严重影响其在功能基因研究中的应用(Tamura *et al*., 2000; Thomas *et al*., 2002)。RNAi 技术是一种很好的探索基因功能的方法(Fire *et al*., 1998)，然而若将目前的家蚕 RNAi 方法体系规模化应用于大量基因的功能探索，其耗费是非常大的。所以，改良现有的干扰技术策略，优化目标基因 dsRNA 获得方法，是进行规模化基因功能探索的必选策略之一。

通过特定细菌株表达目标基因 dsRNA，达到阻抑目标基因表达，产生 RNAi 效应的方法，最早是由 Timmons 和 Fire(1998)在线虫中开创使用的。随后，相关实验方法进一步得到优化，Timmons 等(2001)从多个大肠杆菌菌株筛选到了具有最高 dsRNA 表达效率的 RNase Ⅲ缺陷型菌株 HT115。此后，这一技术策略逐渐在多个物种中广泛应用(Newmark *et al*., 2003; Solis *et al*., 2009)。由于其高效性及耗费不高，甚至成为线虫中进行 genome-RNAi 选用的策略(Kamath and Ahringer, 2003)。在植物中，这种方法也成为植物病毒防治研究中一种新技术(Tenllado *et al*., 2003, 2004)。研究人员发现，将甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)的衣壳蛋白 CP 基因片段构建进入 L4440 载体，导入细菌 HT115，诱导 dsRNA 表达，向玉米喷施细菌 RNA 粗提物，研究发现，喷施后的玉米具有更好的抵抗病毒能力(Gan *et al*., 2010)。

家蚕 BmFTZ-F1 基因是核受体基因家族成员之一，作为一个转录因子，可能参与家蚕的发育变态过程中(Sun *et al*., 1994)。2008 年，我们在前人的基础上，系统地分析了家蚕的核受体基因，并通过体外转录 FTZ-F1 对应的 dsRNA 的方式进行 RNAi，发现 FTZ-F1 表达水平的调低，严重影响了家蚕从幼虫向蛹的变态发育(Cheng *et al*., 2008)。为了探索细菌表达 dsRNA 进行 RNAi 的策略是否能在家蚕中发挥作用，本研究选用已经通过 RNAi 获得功能验证的 FTZ-F1 基因作为靶标基因。研究发现，通过注射细

菌表达的靶标的基因的 dsRNA，能成功获得与以前相类似的干扰表型，经过 RNAi 处理后，FTZ-F1 基因表达水平受到抑制，在分子水平通过荧光定量 PCR 技术得到证实；而直接通过添食 dsRNA 诱导表达后的细菌，却不能获得预期的干扰表型。然而，直接给线虫添食目标基因 dsRNA 表达细菌，便可让目标基因的表达受到抑制。我们推测，这可能与不同的物种对 RNAi 具有不同的敏感程度相关。

本研究首次在家蚕引入了细菌表达 dsRNA 的 RNAi 系统：HT115 细菌株和 L4440 质粒。研究发现，通过一定的改良，基于细菌表达 dsRNA 的这一新的 RNAi 策略能在家蚕中发挥作用。相关研究为在探索经济、高效、便捷的家蚕功能基因研究方法提供了一定参考。同时，由于通过细菌表达，可以很方便地获得大量的 dsRNA，这一方法在农业鳞翅目害虫防控领域具有一定应用前景。

参 考 文 献（References）

Cheng D, Xia Q, Duan J, Wei L, Huang C, Li Z, Wang G, Xiang Z, 2008. Nuclear receptors in *Bombyx mori*: insights into genomic structure and developmental expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1130－1137.

Dai H, Jiang R, Wang J, Xu G, Cao M, Wang Z, Fei J, 2007. Development of a heat shock inducible and inheritable RNAi system in silkworm. *Biomol. Eng.*, 24: 625－630.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806－811.

Gan D, Zhang J, Jiang H, Jiang T, Zhu S, Cheng B, 2010. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep.*, 29: 1261－1268.

Kamath RS, Ahringer J, 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30: 313－321.

Liu C, Shuai XR, Cheng TC, Xu HF, Li CF, Dai FY, Xia QY, Xiang ZH, 2004. Study on the RNA interference of *Bombyx mori* embryo. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 31: 322－327. [刘春，帅小蓉，程廷才，徐汉福，李春峰，代方银，夏庆友，向仲怀，2004. 家蚕胚胎发育时期的 RNA 干涉研究. 生物化学与生物物理进展，31: 322－327]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(－Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 25: 402－408.

Newmark PA, Reddien PW, Cebrià F, Alvarado AS, 2003. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (Suppl. 1): 11861－11865.

Solis CF, Santi-Rocca J, Perdomo D, Weber C, Guillén N, 2009. Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS ONE*, 4: e8424.

Sun GC, Hirose S, Ueda H, 1994. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 162: 426－437.

Tabunoki H, Higurashi S, Ninagi O, Fujii H, Banno Y, Nozaki M, Kitajima M, Miura N, Atsumi S, Tsuchida K, Maekawa H, Sato R, 2004. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *FEBS Lett.*, 567: 175－178.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Eappen A, Kamba M, Kômoto N, Thomas JL, Maucham PB, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 18: 81－84.

Tenllado F, Llave C, Díaz-Ruíz JR, 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res.*, 102: 85－96.

Tenllado F, Martínez-García B, Vargas M, Díaz-Ruíz JR, 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.*, 3: 3.

The International Silkworm Genome Consortium, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1036－1045.

Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Maucham PB, Chavancy G, 2002. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 247－253.

Timmons L, Court DL, Fire A, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263: 103－112.

Timmons L, Fire A, 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395: 854.

Uhlirova M, Foy BD, Beaty BJ, Olson KE, Riddiford LM, Jindra M, 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15607－15612.

Wang G, Liu C, Xia Q, Zha X, Chen J, Jiang L, 2008. Cathepsin B protease is required for metamorphism in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 15: 201－208.

Wang GH, Liu C, Yang YP, Wu XF, Xia QY, 2005. Study of siRNA-directed RNA interference of the genes related ABC transporter in silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 31(2): 117－120. [王根洪，刘春，杨远萍，吴雪峰，夏庆友，2005. siRNA 介导的家蚕 ABC 转运蛋白相关基因的干涉研究. 蚕业科学，31(2): 117－120]

Xia Q, Guo Y, Zhang Z *et al.*, 2009. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326: 433－436.

Xia Q, Zhou Z, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1937－1940.

Xiang ZH, 2003. Silkworm genome project and the silk road in the 21th century in China. *Acta Sericologica Sinica*, 29: 321－322. [向仲怀，2003. 中国家蚕基因组与21 世纪丝绸之路. 蚕业科学，29: 321－322]

Xiang ZH, Yang HM, 2003. The promotion of sericulture and industry by the research of silkworm genomics. *World Sci-tech R & D*, 25: 1－5. [向仲怀，杨焕明，2003. 家蚕基因组研究对蚕业学科和产业发展的影响. 世界科技研究与发展，25: 1－5]

（责任编辑：赵利辉）